

PATENT

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant:

Marie-Christine VERNHES et al.

Confirmation No. B4145AB

Appl. No.: 09/975,953

Group: 1744

Filed: October 15, 2001

Examiner: Unassigned *Seubren*

For:

METHOD FOR ELIMINATING PROTOZOA, IN PARTICULAR FREE LIVING AMOEBAS IN A COLONISED AQUEOUS FLOW, A METHOD FOR TREATING AN AQUEOUS FLOW BY ELECTROPULSING, AND ITS APPLICATION TO ELIMINATING PROTOZOA

RECEIVED

MAY 23 2002

TC 1700

LETTER

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Date: May 21, 2002

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
FRANCE	99/04749	April 15, 1999


A certified copy of the above-noted application is attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 25-0120 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

YOUNG & THOMPSON

By


Robert J. Patch, #17,355

Ref. B4145AB

Attachment

745 South 23rd Street, Suite 200
Arlington, Virginia 22202
(703) 521-2297

(Rev. 04/19/2000)

BEST AVAILABLE COPY

BREVET D'INVENTION



CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 AVR. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

RECEIVED

MAY 23 2002

TC 1700

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 15 04 99</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 99 04749</p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75</p> <p>DATE DE DÉPÔT 15 AVR. 1999</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3, rue Chauveau-Lagarde FR-75008 PARIS</p>	
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p>PROCEDE D'ELIMINATION DES PROTOZOAIRES, NOTAMMENT DES AMIBES LIBRES D'UN FLUX AQUEUX COLONISE, PROCEDE DE TRAITEMENT D'UN FLUX AQUEUX PAR ELECTROPULSATION ET SON APPLICATION POUR ELIMINER DES PROTOZOAIRES.</p>		<p>n° du pouvoir permanent B4145-JV références du correspondant 01 44 51 18 00 téléphone 00</p> <p>date</p>	
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>1) ELECTRICITE DE FRANCE - SERVICE NATIONAL</p> <p>2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</p> <p>Nationalité (s) 1 & 2) Françaises</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>1) 2 rue Louis Murat 75008 PARIS</p> <p>2) 3 rue Michel-Ange 75794 PARIS CEDEX 16</p>		<p>Forme juridique</p> <p>Etablissement public à Caractère Industriel et Commercial</p> <p>Etablissement public</p> <p>Pays</p> <p>France</p> <p>France</p>	
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>			
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>			
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <p>pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande</p>			
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>			
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</p> <p>VAILLANT Jeanne CPI n° 97-0801</p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>	

Loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

A 540 A/151196 H

BEST AVAILABLE COPY

DÉPARTEMENT DES BREVETS

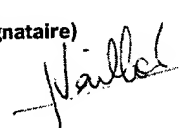
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

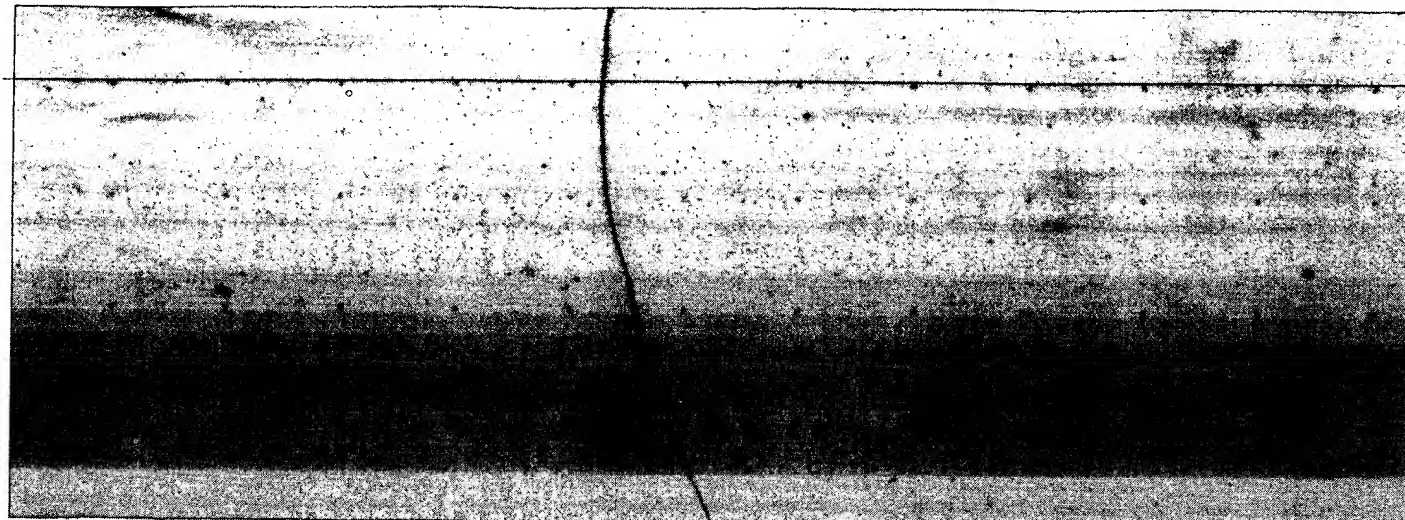
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B4145	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		9904749	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCÉDE D'ELIMINATION DES PROTOZOAIRES, NOTAMMENT DES AMIBES LIBRES D'UN FLUX AQUEUX COLONISE, PROCÉDE DE TRAITEMENT D'UN FLUX AQUEUX PAR ELECTROPULSATION ET SON APPLICATION POUR ELIMINER DES PROTOZOAIRES.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde 75008 PARIS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		VERNHES	
Prénoms		Marie-Christine	
Adresse	Rue	1 Chemin de la Gavette	
	Code postal et ville	81500	LAVAU
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CABANES	
Prénoms		Pierre-André René	
Adresse	Rue	63 rue Ordener	
	Code postal et ville	75018	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		TEISSIE	
Prénoms		Justin	
Adresse	Rue	5 rue Signoret	
	Code postal et ville	31520	RAMONVILLE SAINT-AGNE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Le 3 mai 2000 VAILLANT Jeanne CPI n° 97-0801			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

BEST AVAILABLE COPY

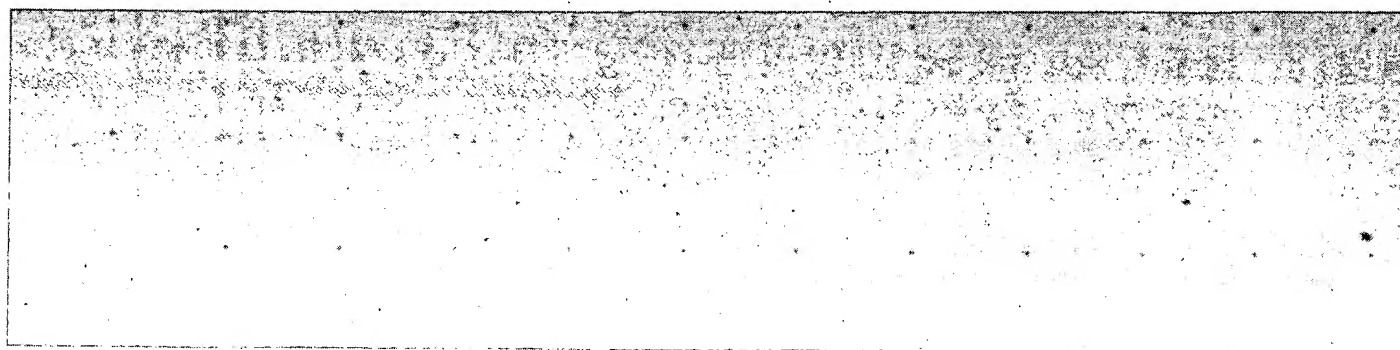


DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
~17, 18			RM	12/4/2000 rep RRP	GS - 29 JAN. 2001

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

11 11 11



BEST AVAILABLE COPY

La présente invention concerne un procédé d'élimination de protozoaires colonisant un milieu aqueux par l'application d'un champ électrique pulsé au milieu, ainsi qu'un procédé de traitement d'un milieu aqueux colonisé par électropulsation et son application à l'élimination des protozoaires.

Des amibes thermophiles sont dites libres car elles peuvent se reproduire sans passer par un hôte intermédiaire. Parmi les nombreuses espèces d'amibes libres, certaines peuvent être à l'origine de pathologies chez l'homme : il s'agit des amibes appartenant aux genres *Naegleria* (espèce *fowleri*), *Acanthamoeba* (plusieurs espèces), et *Balamuthia* (espèce *mandrillaris*). Les amibes libres existent sous plusieurs formes :

- la forme végétative ou trophozoïte, infectante, et sous laquelle elles peuvent se multiplier,
- la forme kystique, de résistance, lorsque les conditions extérieures sont défavorables (par exemple température inférieure à 20°C, présence d'agents oxydants ...),
- et la forme flagellée, seulement pour certaines d'entre elles (notamment *Naegleria fowleri*).

Le milieu naturel de développement des amibes libres est l'eau douce. *Acanthamoeba* semble pouvoir survivre dans l'eau de mer, *Naegleria* ne tolère pas une salinité supérieure à 5 g/l. *N. Fowleri* croît et se multiplie au-dessus d'une température de 20°C, avec une température optimale de 25 à 45°C. D'autres facteurs, tels que la présence de particules organiques en suspension, de bactéries ou de nutriments, semblent également nécessaires à leur multiplication. Enfin, la présence d'une interface solide chaude, notamment s'il y a peu de courant, serait particulièrement propice à leur développement.

Dans les milieux naturels, dans les régions tempérées, l'abondance des amibes est essentiellement observée lors d'étés chauds. On peut également la retrouver dans les eaux artificiellement réchauffées (piscines,

rejet de sites industriels). Par exemple, une eau chaude naturelle en Australie a pu contenir 900 à 1000 *N. fowleri* par litre. Dans une eau artificiellement réchauffée, comme dans la lagune de rejet de certaines centrales thermiques, les concentrations ne dépassaient pas 1,6 par litre.

- 5 En revanche, pour les centrales ayant un circuit tertiaire de refroidissement fermé dans lequel l'eau tourne "en boucle" (avec toutefois un appoint extérieur accompagné d'un faible rejet), les concentrations de *N. fowleri* sont plus importantes. *Acanthamoeba* est couramment retrouvée dans les eaux domestiques et dans les eaux douces naturelles. Par ailleurs, un
- 10 portage humain a été observé de façon directe dans de nombreux pays, dans les cavités nasales, la gorge ou le tube digestif dans une faible proportion des populations étudiées. En revanche, dans les pays chauds, une majorité de sujets peut présenter des anticorps sanguins dirigés contre *N. fowleri* et *Acanthamoeba*, et on conclut qu'il y a donc une large
- 15 exposition aux amibes libres dans ces populations.

- N. fowleri* provoque une méningo-encéphalite. La voie exclusive de contamination est la muqueuse nasale, les amibes traversant ensuite les barrières muqueuses et osseuses pour atteindre le cerveau. Si tout risque de contamination par voie digestive, notamment pour l'eau de boisson, est
- 20 exclu de l'ensemble des cas rapportés, un grand nombre de cas paraît associé à l'exposition aquatique dans une eau relativement chaude, par baignade ou sports nautiques, ce qui pourrait expliquer que la maladie frappe plus fréquemment les enfants et les jeunes gens en raison d'une pratique plus importante des sports nautiques. Ce fait peut aussi
- 25 correspondre à une immunité moins développée que chez l'adulte vis-à-vis de ces protozoaires. La maladie est très rare, puisque seulement 180 cas ont été rapportés au 1er janvier 1998 pour l'ensemble de la planète. La disparité entre l'ubiquité du protozoaire et la rareté des manifestations pathologiques qu'il entraîne est donc frappante, même s'il est très probable
- 30 que certains cas ont pu échapper au diagnostic, en raison même de la rareté de la maladie, et du fait de l'absence de spécificité du tableau

BEST AVAILABLE COPY

clinique. Après l'exposition à un milieu aquatique contaminé, le délai d'apparition des signes cliniques semble être de trois à cinq jours. De très nombreux traitements antibiotiques ont été tentés. Les résultats sont décevants ; la littérature ne rapporte que six cas de survie. Par ailleurs, 5 diverses espèces du genre *Acanthamoeba* peuvent provoquer des kératites, notamment chez les porteurs de lentilles de contact (problème du rinçage avec de l'eau non stérile). Enfin, diverses espèces du genre *Acanthamoeba* et du genre *Balamuthia* peuvent entraîner des encéphalites granulomateuses, chez des personnes dont les défenses immunitaires sont 10 déficientes. Dans ce cas, la porte d'entrée est souvent cutanée.

En terme de prévention, il faut souligner que le risque croît de façon exponentielle avec le niveau de colonisation, ce qui explique le peu de cas observés de par le monde, mais aussi la possibilité d'émergence de cas groupés si une même source est très contaminée (16 décès liés à des 15 baignades dans une piscine en République Tchèque). Ainsi lorsque la surveillance métrologique d'un milieu fait apparaître un risque trop élevé de méningo-encéphalite, un traitement s'impose.

Jusqu'à présent ce traitement a essentiellement été basé sur la chloration (lacs américains), ou la chloramination, comme en Australie 20 dans le réseau d'eau potable. En France, la constatation d'une multiplication de ces amibes dans certaines centrales peut amener l'entreprise EDF à pratiquer des chlurations durant certains étés. Cette méthode est efficace si les niveaux de chlore libre résiduels sont suffisamment importants et si le traitement est continu. Dans le cas de forts 25 débits à traiter, surtout en eau brute, ce traitement entraîne la production de sous-produits qui sont alors relâchés dans l'environnement. Ces produits pouvant avoir une toxicité pour l'homme à long terme, il a paru nécessaire de rechercher une autre méthode de traitement.

Il existe un besoin pour un procédé et des installations capables de 30 détruire des protozoaires et notamment des amibes libres de façon

efficace, sans entraîner d'effet secondaire et qui fonctionnent en permanence dans de bonnes conditions économiques.

Certains effets liés à l'application d'un champ électrique sur une suspension cellulaire ont déjà été décrits : lorsque l'on place une cellule
 5 dans un champ électrique, les lignes de champ sont déviées par celle-ci, ce qui provoque une accumulation des charges à la surface de la cellule. Ainsi, il en résulte une différence de potentiel transmembranaire induite ΔV qui se superpose à la différence native $\Delta \Psi_0$ [Bernhardt J. et Pauly H. (1973):(1)].

10 La formule la plus complète retenue dans le cas d'un champ à cinétique en vague carrée et d'une cellule sphérique en suspension est la suivante [Kinosita et Tsong (1979) (2)] :

$$\Delta V(t) = fg(\lambda) r E(t) \cos \theta (1 - e^{-t/\tau_p}) \quad \text{éq 1}$$

15

L'expression de cette différence de potentiel induite en un point M au temps t est fonction de :

- E : l'intensité du champ électrique appliqué,
- f : le facteur forme de la cellule (1,5 dans le cas d'une sphère),
- 20 g (λ) : facteur lié aux conductivités des milieux externe et interne et à celle de la membrane de la perméabilité membranaire λ ,
- r : le rayon de la cellule,
- θ : l'angle entre le vecteur champ électrique macroscopique et la normale au plan de la membrane au point considéré M,
- 25 τ_p : est le temps de charge de la capacité membranaire (de l'ordre de la microseconde),
- t : temps d'application du champ.

Lorsque la durée des impulsions est très supérieure au temps de charge de la membrane ($t \gg \tau_p$), le terme $(1 - e^{-t/\tau_p})$ devient très proche de 1,
 30 on retrouve alors, à l'état stationnaire la formulation classique :

$$\Delta V = fg(\lambda) r E \cos \theta$$

éq 2

Le terme en $\cos \theta$ indique que pour une valeur de champ donnée,
 5 l'amplitude de cette différence de potentiel n'est pas identique en tout point
 de la cellule. Elle est maximale aux points faisant face aux électrodes
 (pôles) et diminue le long de la surface cellulaire pour s'annuler à
 l'équateur.

Cette différence de potentiel généré par le champ s'ajoute à la
 10 différence de potentiel de repos $\Delta\Psi_o$. Il en résulte une différence de
 potentiel résultante ΔV_r .

$$\Delta V_r = \Delta\Psi_o + \Delta V$$

éq 3

15 Au niveau de l'hémisphère cellulaire situé face à l'anode, les
 valeurs numériques de $\Delta\Psi_o$ et de ΔV s'additionnent pour tenir compte de la
 vectorialité de l'effet du champ, ce qui entraîne une hyperpolarisation de la
 membrane. En revanche, au niveau de l'hémisphère situé face à la
 cathode, les valeurs numériques de $\Delta\Psi_o$ et de ΔV se retranchent, et la
 20 membrane subit une dépolarisation.

Lorsque cette différence de potentiel membranaire résultante
 devient supérieure à une valeur seuil estimée à 200-250 mV [Teissié et
 Tsong (1981):(3)], il y a induction d'un phénomène de perméabilisation [Ho
 25 et Mittal (1996):(4)].

La structure membranaire responsable de cette perméabilité
 membranaire est inconnue à ce jour, et on emploie préférentiellement le
 terme de structure transitoire de perméabilisation (STP), ce qui est exprimé
 de façon usuelle par le terme de "pores".

BEST AVAILABLE COPY

Si les conditions d'électroperméabilisation sont contrôlées, ce phénomène de perméabilisation est transitoire et réversible, et affecte peu ou pas la viabilité cellulaire. Cette propriété induite par le champ permet d'avoir un accès direct au contenu cytoplasmique [Mir et al. (1988):(5); Tsong (1991):(6); Hapala, (1997):(7)]. Ceci permet de faire pénétrer dans la cellule des molécules étrangères et naturellement non perméantes et de modifier ainsi son contenu de façon soit transitoire (électrochargement), soit permanente, dans des techniques d'électrotransformation, électroinsertion, par exemple.

En revanche, dans des conditions d'électropulsation particulières drastiques, l'électroperméabilisation est un phénomène irréversible qui conduit à la mort cellulaire ou électromortalité [Sale et Hamilton (1967):(9), (1968):(10), Kekez et al. (1996):(14)]. Cette propriété a été utilisée soit pour lyser des cellules afin de récupérer un métabolite d'intérêt, non excrété naturellement par la cellule, soit pour éradiquer des cellules en environnement (désinfection) ou ayant comme perspective de stériliser de façon non thermique des fluides alimentaires [Jayaram et al. (1992):(16), Knorr et al. (1994):(17); Qin et al. (1996):(18); Qin et al. (1998):(19)].

Cette technique a été appliquée à de nombreux types cellulaires : des bactéries [(Sale et Hamilton, (1967):(8); (Hülshager et al., (1981, 1983):(11, 12); (Mizuno et Hori, (1988):(13); Jayaram et al., (1992):(16); Grahl et Märkl, (1996):(15); Pothakamory et al., (1996):(26); des levures [Sale et Hamilton, (1967):(9); Hülshager et al., (1983):(12); Mizuno et Hori, (1988):(13); Grahl et Märkl, (1996):(15); Gaskova et al., (1996):(28); (Qin et al., (1996):(18), Martin-Belloso et al., (1997):(27)], des cellules animales [Hamilton et Sale, (1967):(8); Sale et Hamilton, (1968):(10)], et des cellules végétales [Hamilton et Sale, (1967):(8); Sale et Hamilton, (1968):(10); Knorr et al., 1994):(17)]. Néanmoins, les protozoaires et notamment les amibes libres n'ont jusqu'à présent pas fait l'objet de tels traitements.

Il existe deux systèmes de pulsation suivant le volume traité (a) un système de pulsation à lit fixe encore appelé batch, qui ne permet de traiter

que de faibles volumes suivant les dimensions des électrodes et (b) un système de pulsation en flux qui permet de traiter une suspension cellulaire en écoulement.

La majorité des auteurs ayant publié dans ce domaine ont travaillé
5 en batch [(9);(10);(11);(12);(13);(16);(28);(26)].

Concernant le processus en écoulement, deux stratégies ont été décrites : le flux continu et le flux séquentiel.

Dans le modèle du flux séquentiel, la chambre de pulsation est remplie, le flux est arrêté, le champ est ensuite appliqué puis la chambre
10 est vidée. Ce modèle en flux séquentiel a été développé pour des travaux d'électrofusion où le contact est médié par diélectrophorèse.

L'avantage du système en flux est de pouvoir traiter des volumes importants.

La plupart des auteurs ont utilisé des systèmes à champ
15 perpendiculaire à l'écoulement de la solution [(20);(21);(22);(23);(24);(25);(18)] ou des systèmes avec des électrodes coaxiales donnant un champ non uniforme mais également perpendiculaire à l'écoulement [(18);(27);(19)].

Les demandeurs ont maintenant mis au point un procédé de
20 traitement de milieux contaminés par des protozoaires, par application d'un champ électrique pulsé.

Ce procédé peut être appliqué soit en écoulement, soit en pulsation statique. Ce procédé de traitements des milieux colonisés, comparé à la chloration et la chloramination, a la particularité d'être une
25 méthode moins invasive vis à vis de l'environnement.

Ce procédé remédie aux inconvénients des procédés connus, notamment pour de grands volumes à traiter.

Selon un objet de l'invention, celle-ci concerne un procédé de destruction des protozoaires caractérisé en ce que l'on soumet un flux
30 aqueux colonisé à un champ électrique d'une intensité variant de 1 à 30 kV/cm, de préférence 1,5 à 15 kV/cm. Concernant le profil des

impulsions, il peut être notamment de type vague carrée, déclins exponentiels, trapèze, sinusoïdal ou bipolaire.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de traitement d'un milieu aqueux colonisé par des cellules protozoaires par un
5 champ électrique pulsé appliqué au flux, caractérisé en ce que le champ appliqué a une intensité variant de 1 à 30 kV/cm, de préférence 1 à 15 kV/cm.

Dans ces procédés, on peut parvenir à une décontamination totale des amibes libres dans certains milieux aqueux. Selon les conditions
10 électriques utilisées, on parvient à une décontamination totale des amibes libres, soit à une réduction de l'ordre de 95% du nombre d'amibes libres.

Ainsi, l'invention concerne également l'application du procédé de traitement d'un milieu aqueux colonisé de l'invention à l'élimination des protozoaires.

15 L'invention sera mieux comprise au vu des figures annexées et de la description détaillée ci-après.

Les figures 1a et 1b représentent schématiquement les installations utilisables pour mettre en oeuvre les procédés décrits.

La figure 2 représente l'évolution en parallèle du taux de perméabilisation cellulaire et de la viabilité des amibes en fonction de
20 l'intensité du champ électrique appliquée.

La figure 3 représente le pourcentage de viabilité résiduelle (illustre la mortalité) pour différentes valeurs de l'intensité du champ, pour des orientations parallèles, perpendiculaires à l'écoulement du flux et en batch.

25 La figure 4 illustre l'évolution à énergie constante 25 J/cm^3 de la viabilité à long terme et du taux de perméabilisation des cellules.

La figure 5 illustre l'optimisation de l'énergie.

Par milieu colonisé selon l'invention, on entend tout milieu aqueux domestique, naturel ou industriel pouvant comporter ou comportant des
30 protozoaires, notamment des amibes, et particulièrement des amibes libres, comme des eaux de baignade naturelles ou réchauffées, piscines et

bains, des eaux de rejets industriels, des milieux aqueux des circuits de refroidissement ou de chauffage, des milieux aqueux des circuits de ventilation et de climatisation, des eaux potables, et de façon générale tout milieu où des protozoaires et notamment des amibes, et particulièrement
 5 des amibes libres sont susceptibles de vivre, survivre ou se multiplier.

Les procédés de l'invention sont mis en oeuvre dans des installations en flux continu, ou en flux séquentiel.

En ce qui concerne les impulsions, leur nombre peut varier de 1 à 100 impulsions successives, notamment de 1 à 50, de préférence 1 à 10.
 10 Leur durée peut varier de 0,5 μ s à 24 ms, notamment 1 μ s à 10 ms environ.

Concernant le profil des impulsions, il peut être notamment de type vague carrée, déclins exponentiels, trapèze, sinusoïdal ou bipolaire.

Les impulsions peuvent être délivrées avec une fréquence allant de
 15 1 à 2000 Hz.

Ainsi, on a déterminé des conditions d'application efficaces pour des intensités de l'ordre de 1,5 kV/cm à 30 kV/cm, des impulsions de 0,5 μ s à 24 ms et un nombre d'impulsions appliquées à la cellule allant de 1 à 100.

20 De préférence, on applique dix impulsions de 10 ms à 1,5 kV/cm, ou encore une impulsion de 10 μ s à 11 kV/cm, ou encore une impulsion de 50 μ s à 9 kV/cm.

Exemple 1

25 Les expériences ont été réalisées sur des amibes *Naegleria lovaniensis* Ar9M1. La souche choisie se dénomme Ar-9M1. Cette dernière a été isolée dans les eaux chaudes (45°C) d'une centrale thermique de Floride en 1976 (Stevens et al., 1979). Cette espèce est la plus proche du point de vue phylogénique de l'espèce pathogène : *N. fowleri* Pernin et al.,
 30 1985 montrent que *N. lovaniensis* et *N. fowleri* descendent d'un ancêtre

commun. Ces deux espèces sont toutes les deux thermophiles et se développent particulièrement bien à une température d'environ 44°C. Par ailleurs, le fait qu'elles aient des profils isoenzymatiques très proches montre qu'elles ont également des caractéristiques physiologiques similaires. Les trophozoïtes de *N. lovanensis* Ar-9M1 ont une taille de 18,2 μm (8,5-31,5) x 10,9 μm (4-21). Les kystes ont quant à eux un diamètre de 10,3 μm (7,5-12,5). Les caractéristiques de taille sont proches de celles de *N. fowleri*. Pour travailler sur la forme végétative, on utilise la culture axénique. Dans ce type de culture les éléments nutritifs ne sont pas apportés par des bactéries mais par un milieu nutritif. La culture est réalisée en condition axénique sur des boîtes de plastique à 37°C en utilisant le milieu de culture de Chang. Le milieu de pulsation est de l'eau de la Garonne, filtrée ayant une conductance de l'ordre de 200 $\mu\text{s/cm}$.

Les générateurs

Les générateurs utilisés dans cette étude (CNRS et Cober 605p) génèrent des impulsions à cinétique en vague carrée de polarité négative. La durée des impulsions est variable entre 5 μs et 24 ms et la fréquence d'application de 0,1 à 10 Hz en pilotage interne et de 2000 Hz en pilotage externe. Le voltage délivré par l'appareil est de 1500 volts maximum (8 A). Le Cober 605P a été utilisé pour délivrer des champs intenses ($7 \text{ kV/cm} \leq E < 10 \text{ kV/cm}$) en appliquant une seule impulsion de durée $< 300 \mu\text{s}$. Ce dernier est susceptible de délivrer une tension de sortie de 2 kV(10A).

Le montage expérimental

Il est placé à l'intérieur d'un hotte au flux laminaire afin de travailler dans les conditions de sécurité requises. La viabilité est évaluée à 24 heures après le traitement électrique par la technique de coloration au cristal violet.

La perméabilisation des cellules est quantifiée en cytométrie de flux par l'utilisation d'un marqueur fluorescent naturellement non perméant, l'iodure de propidium.

Batch : la chambre de pulsation C est constituée de deux
5 électrodes à lames planes en acier, maintenues parallèles par des cales isolantes reliées à un électropulsateur (E) et un oscilloscope (O). La distance 2 entre les électrodes est de 0,4 cm ou de 0,25 cm. Sur la figure 1a, la flèche indique le dépôt des cellules.

Flux : le système de pulsation mis au point au laboratoire est
10 constitué de différents éléments : un réservoir 1 de cellules doté notamment d'un dispositif d'agitation 2, une pompe péristaltique 3, une chambre de pulsation 4 reliée à un électropulsateur 5 et un oscilloscope 6 et un système collecteur 7 permettant de récupérer les cellules (cf. figure 1b).

15 La pompe péristaltique (pompe, minipuls 3, Gilson) assure une surpression dans le réservoir de cellules, ce qui permet d'entraîner la suspension cellulaire vers la chambre d'électropulsation, sans passage entre les galets de la pompe. Celle-ci est dotée d'un système débimétrique qui permet de régler le débit de manière précise. Le débit Q utilisé est basé
20 sur la notion de temps de résidence de façon à ce que chaque cellule qui rentre dans la chambre de pulsation subisse les mêmes conditions électriques. Il est défini par la fréquence (F), le nombre (N) des impulsions et par le volume (V) de la chambre de pulsation par la relation suivante :

$$25 \quad Q(\text{ml/minute}) = \frac{\text{fréquence (Hz)} \times 60 \times \text{Volume de la chambre (ml)}}{\text{nombre d'impulsions appliquées}}$$

30 Descriptif des électrodes en écoulement

1 - Champ perpendiculaire à l'écoulement : les électrodes sont constituées par deux lames parallèles en acier séparées par une distance interélectrode de 0,4 cm. Le volume de la chambre de pulsation est de 0,2 ml.

5 2 - Champ parallèle à l'écoulement : les électrodes utilisées sont des grilles, constituées d'un maillage ($80\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$), au travers duquel les cellules transitent. La distance interélectrode est de 0,93 cm et le volume de la chambre de pulsation est de 0,117 ml.

Les électrodes dans les deux systèmes sont connectées à un
10 générateur de haute tension soit CNRS, soit COBER 605P relié à un oscilloscope (Enertec) permettant ainsi de visualiser les paramètres électriques délivrés. Le profil cinétique des impulsions délivrées par le générateur est dit en vague carrée, l'intensité du champ demeurant constante durant toute la durée des impulsions (T). La flexibilité de
15 l'électropulsateur permet de moduler la tension (U), la durée (T), le nombre (N), et la fréquence (F) des impulsions.

Il est possible d'optimiser la méthode tout en minimisant le coût énergétique. Il a été montré que la perte de viabilité n'était pas tant liée à l'énergie apportée au système durant l'électropulsation qu'à la façon dont
20 cette énergie est apportée.

Comme cela est illustré à la figure 2, on peut évaluer l'évolution en parallèle, du niveau de perméabilisation et de la perte de viabilité, en fonction de l'intensité du champ électrique. Les amibes ont été électropulsées à des intensités de champs variables par dix impulsions de
25 10 ms, délivrées à la fréquence d'1 Hz. La viabilité est évaluée 24 heures après l'électropulsation par la technique de coloration au crystal violet. La perméabilisation est quantifiée en cytométrie de flux, par l'entrée d'un marqueur non perméant fluorescent, l'iodure de propidium.

De plus, comme cela est illustré à la figure 3, on a comparé
30 l'efficacité de destruction des amibes (% de viabilité) par le champ

électrique selon la configuration utilisée (batch, champ parallèle en flux, champ perpendiculaire en flux). Les cellules, dans les trois cas, sont électropulsées par dix impulsions de 10 ms délivrées avec une fréquence de 1 Hz. Les deux chambres de pulsation en flux ont des volumes
 5 différents, ce qui explique pourquoi les débits utilisés pour avoir les mêmes conditions d'électropulsation sont différents.

Le débit dans le cas où le champ est perpendiculaire à l'écoulement (2-grisé) est de 1,2 ml/min alors que celui dans la configuration du champ parallèle à l'écoulement (1-noir) est de 0,71 ml/min.

10 La figure 4 représente l'évolution à énergie constante 25 J/cm^3 de la viabilité à long terme (■) et du taux de perméabilisation (□).

On a fait varier l'intensité du champ électrique (E) et la durée cumulée totale de pulsation (T) tout en maintenant la valeur du produit $E^2 \times T$ constante. La durée des impulsions est fixée arbitrairement à 10ms
 15 et les impulsions sont délivrées à la fréquence d'1Hz. La viabilité ■ est révélée à 24h par la technique de coloration au crystal violet. La perméabilisation (□) est quantifiée en cytométrie de flux, par l'entrée d'un marqueur non perméant fluorescent, l'iodure de propidium. Cinq conditions d'électropulsation sont utilisées :

- 20
- (1) 10 msx1, E = 3,46 kV/cm
 - (2) 10 msx2, E = 2,5 kV/cm
 - (3) 10 msx3, E = 2 kV/cm
 - (4) 10 msx10, E = 1,1 kV/cm
 - (5) 10 msx50, E = 0,5 kV/cm

25

Les amibes sont plus sensibles à l'utilisation d'impulsions de courte durée mais de forte intensité qu'à l'utilisation pendant des temps de pulsation très longs d'impulsions de faible intensité. La destruction des amibes dépend essentiellement de l'intensité du champ électrique appliqué
 30 et non de la durée de pulsation effective.

Le tableau suivant représente pour diverses intensités de champ les temps des impulsions nécessaires à obtenir 95% de mortalité et l'énergie associée. Il montre que plus l'intensité du champ est forte, moins l'énergie à apporter au système est importante.

E(kV/cm)	T(μ s)	Energie (J/cm ³)	Puissance nécessaire pour traiter 1m ³ /s (MW)
10,8	10	0,232	0,232
8,9	50	0,8	0,8
8	100	1,3	1,3
7	250	2,45	2,45

5

La figure 5 montre les résultats des expérimentations menées pour des champs allant jusqu'à 8,8 kV/cm dans les conditions suivantes :

- (1) 250 μ s, 7 kV/cm
- (2) 100 μ s, 8 kV/cm
- (3) 75 μ s, 8,43 kV/cm
- (4) 50 μ s, 8,8 kV/cm
- (5) 0 μ s, 0 kV/cm

10

Les amibes sont électropulsées à des intensités de champ électrique variables pour une seule impulsion de faible durée. La viabilité (% de viabilité) est évaluée 24 heures après l'électropulsation par la technique de coloration au crystal violet. Ces paramètres obéissent à la loi suivante $E = 5,4 - 2,7 \log T$ avec T en ms et E en kV/cm et T inférieur à 100ms.

15

REFERENCES

1. Bernhardt J. et al., *Biophysik*. 10: 89-98 (1973)
- 5 2. Kinoshita K. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 554: 479-497 (1979)
3. Teissié J. et al., *Biochemistry* 20: 1548-1554 (1981)
4. Ho S.Y. et al., *Critical Reviews in Biotechnology*, 16: 349-362 (1996)
5. Mir L.M. et al., *Experimental Cell Research* 175: 15-25 (1988)
6. Tsong T.Y., *Biophys. J.* 60: 297-306 (1991)
- 10 7. Hapala I, *Critical Reviews in Biotechnology* 17: 105-122 (1997)
8. Hamilton W.A. et al., *Biochim. Biophys. Acta*. 148: 789-800 (1967)
9. Sale J.H. et al., *Biochim. Biophys. Acta*. 148: 781-788 (1967)
10. Sale J.H. et al., *Biochim. Biophys. Acta*. 163: 37-43 (1968)
11. Hulsheger H. et al., *Radiat. Environ. Biophys.* 20: 53-65 (1981)
- 15 12. Hulsheger H. et al., *Radiat. Environ. Biophys.* 22: 149-162 (1983)
13. Mizuno A. et al., *IEEE Transactions on Industry Applications* 24: 387-394 (1988)
14. Kekez M.M. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1278: 79-88 (1996)
15. GralhT. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 148-157 (1996)
- 20 16. Jayaram S. et al., *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 1412-1420 (1992)
17. Knorr D. et al, *Trends in Food Science and Technology* 51: 71-75 (1994)
18. Qin B-L. et al., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36: 603-627 (1996)
- 25 19. Qin B-L. et al., *IEEE Transactions on Industry Application*. 34: 43-50 (1998)
20. Teissié J. et al., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19: 49-57 (1988)
21. Teissié J. et al., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19: 59-66 (1988)
- 30 22. Sixou S. et al., *Biochim. Biophys. Acta*. 1028: 154-160 (1990)

BEST AVAILABLE COPY

23. Teissié J. et al., "Charge and Field effects in Biosystems III", Allen Ed, Birkhauser press pp 449-466 (1992)
24. Rols M.P. et al., Eur. J. Biochem. 206: 115-121 (1992)
25. Bruggemann U. et al., Transfusion 35: 478-486 (1995).
- 5 26. Pothakamury U.R. et al. Journal of Protection 59:1167-1171 (1996)
27. Martin-Bellaos o.m. et al. Journal of Food Processing and Preservation 21:193-208 (1997)
28. Gaskova et al. Bioelectrochem. Bioenerg. 39: 195-202 (1996).

BEST AVAILABLE COPY

REVENDECATIONS

1. Procédé de traitement d'un flux aqueux colonisé par des cellules par application d'un champ électrique pulsé, caractérisé en ce que
5 l'on soumet un flux aqueux colonisé à un champ électrique d'une intensité variant de 1 à 30 kV/cm.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nombre d'impulsions appliquées varie de 1 à 50.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en
10 ce que le flux est continu.
4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le flux est séquentiel.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les pulsations ont un profil de type vague carrée, à déclin
15 exponentiel, sinusoïdal, bipolaire ou trapèze.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les impulsions sont délivrées avec une fréquence de 1 Hz à 2000 Hz.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications de 1 à 6,
20 caractérisé en ce que les impulsions ont une durée de l'ordre de 1 μ s à environ 10 ms.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le champ est parallèle au flux.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7
25 caractérisé en ce que le champ est sensiblement perpendiculaire au flux.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les cellules sont des protozoaires, en particulier des amibes libres.
11. Procédé de destruction de protozoaires dans un flux aqueux
30 colonisé par des protozoaires, caractérisé en ce qu'un champ électrique pulsé est appliqué au flux à une intensité de 1 à 30 kV/cm.

BEST AVAILABLE COPY

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le nombre d'impulsions appliquées varie de 1 à 50.

13. Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que le flux est continu.

5 14. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le flux est séquentiel.

15. Procédé selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que les pulsations ont un profil de type vague carrée, à déclin exponentiel, sinusoïdal, bipolaire ou trapèze.

10 16. Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que les impulsions sont délivrées avec une fréquence de 1 Hz à 2000 Hz.

15 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications de 11 à 16, caractérisé en ce que les impulsions ont une durée de l'ordre de 1 μ s à environ 10 ms.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, caractérisée en ce que le champ est parallèle au flux.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17 caractérisé en ce que le champ est sensiblement perpendiculaire au flux.

20 20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 19, caractérisé en ce que les protozoaires sont des amibes libres.

21. Application du procédé selon les revendications 1 à 10 à l'élimination des protozoaires.

BEST AVAILABLE COPY

REVENDICATIONS

1. Procédé de destruction de protozoaires dans un flux aqueux colonisé par des protozoaires, caractérisé en ce qu'un champ électrique pulsé est appliqué au flux.
5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le champ électrique appliqué au flux a une intensité allant de 1 à 30 kV/cm.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le champ électrique appliqué au flux a une intensité allant de 1,5 à 15
10 kV/cm.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le nombre d'impulsions appliquées varie de 1 à 50.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le flux est continu.
- 15 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le flux est séquentiel.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les pulsations ont un profil de type vague carrée, à déclin exponentiel, sinusoïdal, bipolaire ou trapèze.
- 20 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les impulsions sont délivrées avec une fréquence de 1 Hz à 2000 Hz.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications de 1 à 8, caractérisé en ce que les impulsions ont une durée de l'ordre de 1 μ s à
25 environ 10 ms.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le champ est sensiblement parallèle au flux.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le champ est sensiblement perpendiculaire au flux.

BEST AVAILABLE COPY

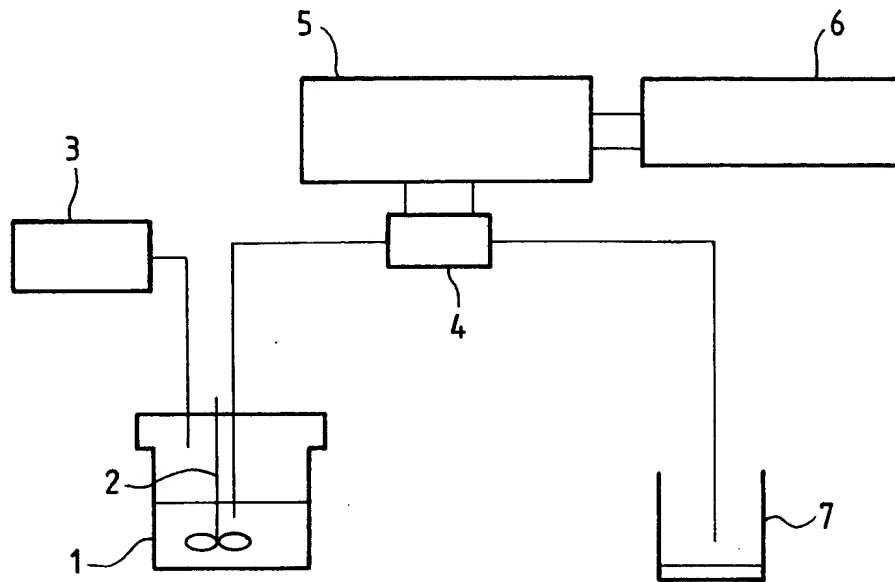
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les protozoaires sont des amibes.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les protozoaires sont des amibes libres.

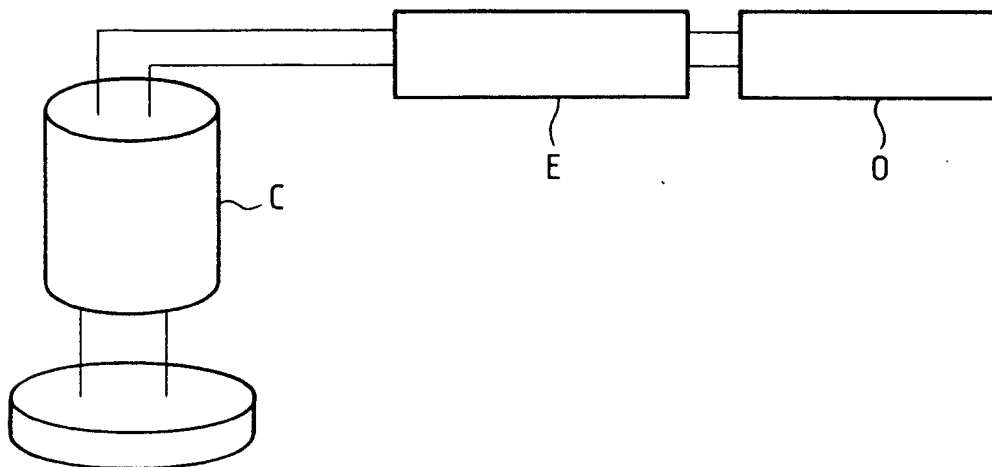
5 14. Application du procédé selon les revendications 1 à 11 à l'élimination des protozoaires.

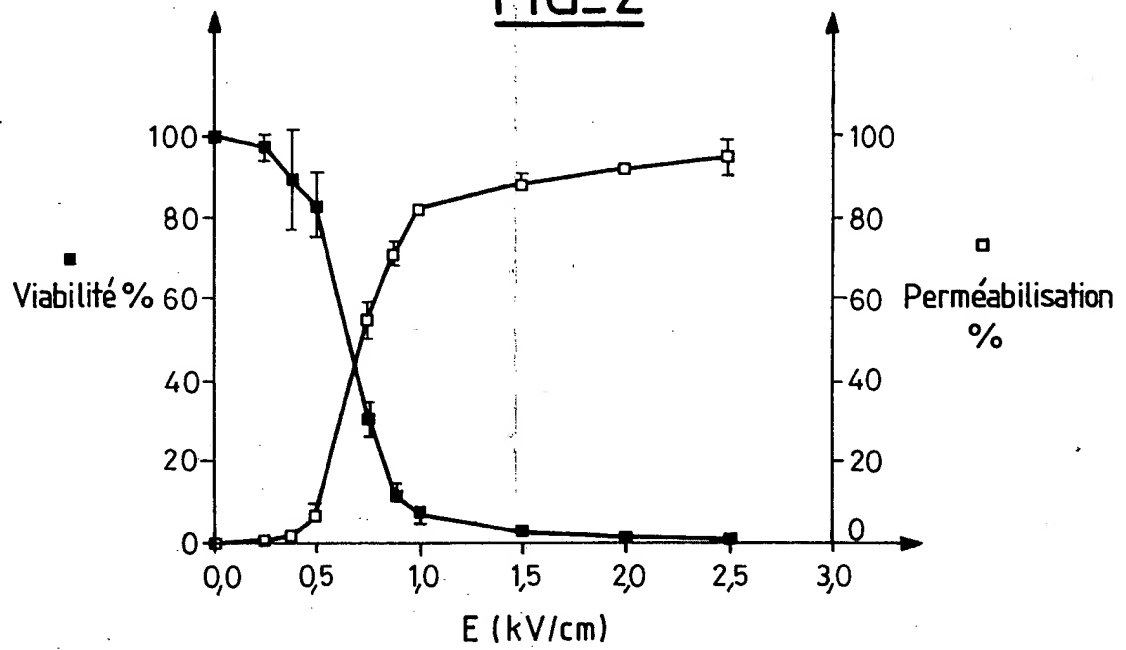
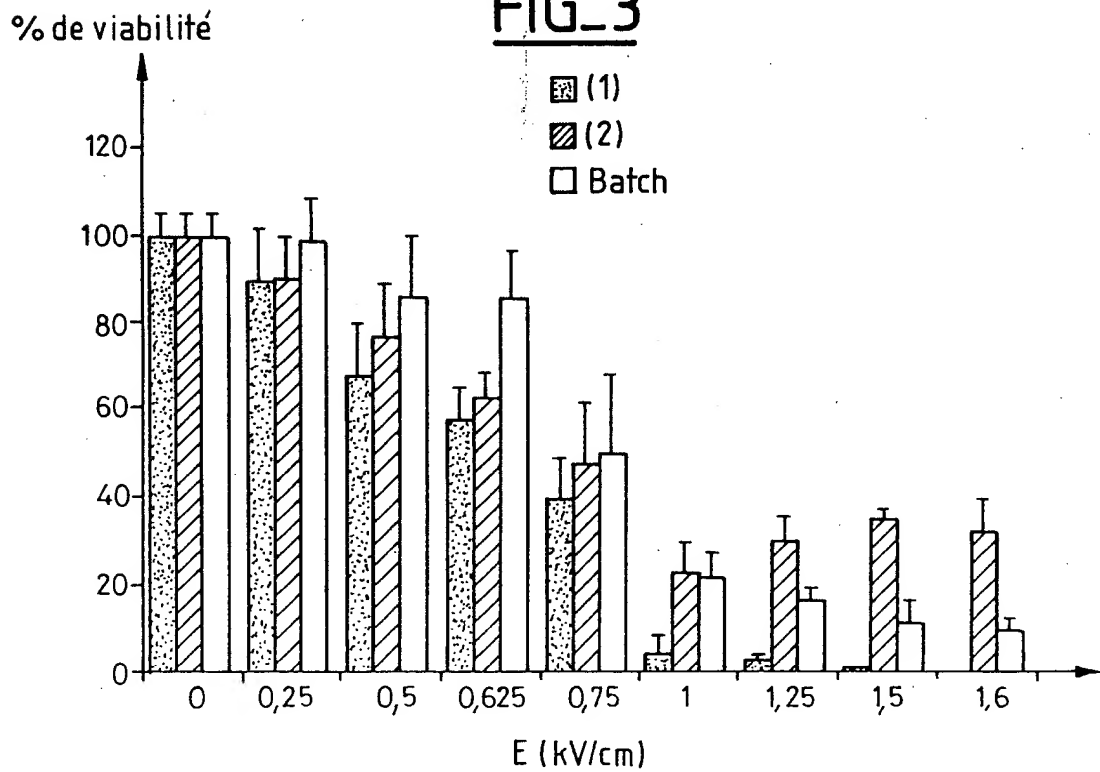
BEST AVAILABLE COPY

FIG_1b



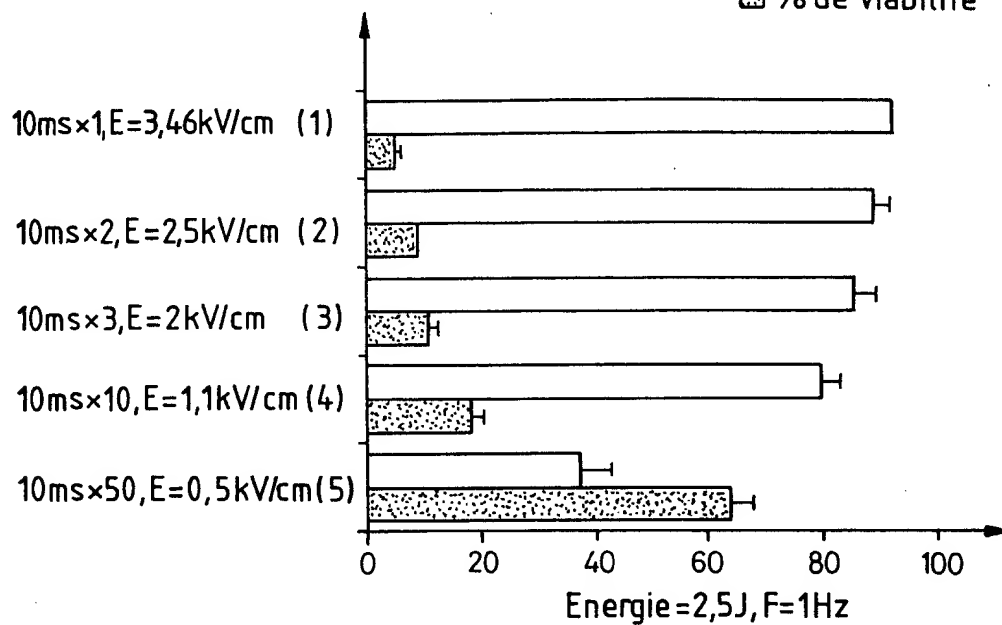
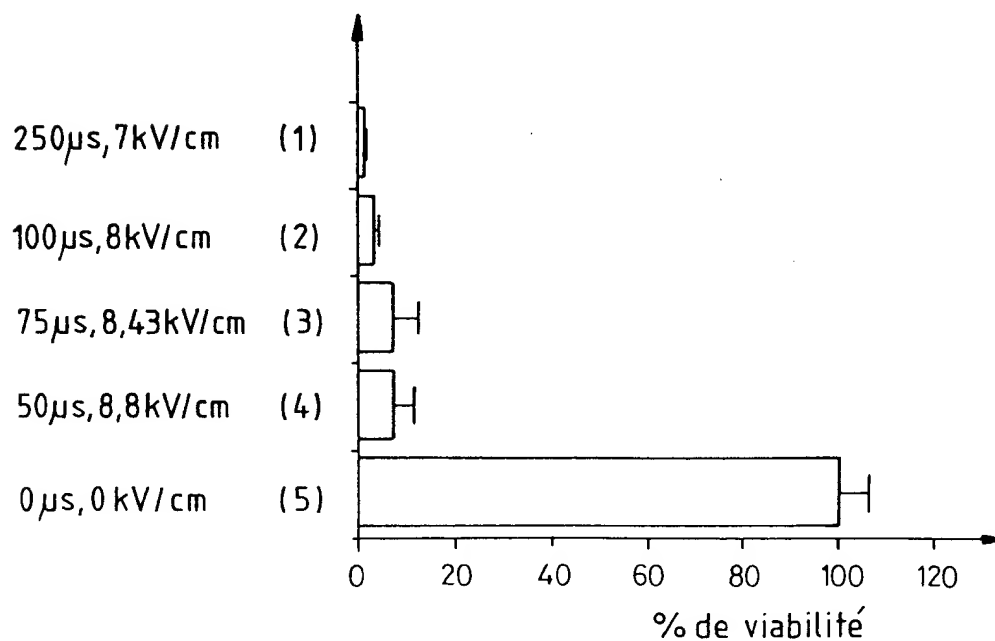
FIG_1a



FIG_2FIG_3

FIG_4

□ % de perméabilisation
 ▨ % de viabilité

FIG_5

Particular Free Living Amoebas in a
Colonised Aqueous Flow, a Method for

~~Treating an Aqueous Flow by~~
Electropulsing, ...

Filing Date: October 15, 2001

Appl. No.: 09/975,953

Docket No.: B4145AB

YOUNG & THOMPSON

(703) 521-2297

BEST AVAILABLE COPY